

Zur Biologie und Mikrochemie einiger *Pirola*-Arten

Von

Paula Fürth

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität in Wien
(Nr. 142 der zweiten Folge)

(Mit 1 Tafel und 3 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 4. November 1920)

Inhaltsübersicht:

Einleitung	560
I. Die Fortpflanzung einiger <i>Pirola</i> -Arten	560
A. Literatur	560
B. Eigene Beobachtungen	563
1. Eigene Beobachtungen in der Natur	563
2. Keimungsversuche	567
II. Anatomie des Samens	568
III. Die Mykorrhiza	570
A. Literatur	570
B. Eigene Beobachtungen	572
IV. Versuche über die Kultur des Mykorrhizapilzes	577
V. Diverse Beobachtungen	578
A. Der Bau der Blattepidermis von <i>Pirola chlorantha</i>	578
B. Über die Verbreitung von Phloroglucotannoiden bei den <i>Pirola</i> -Arten	581
C. Über einen schön krystallisierenden Inhaltskörper der <i>Pirola uniflora</i>	582
Zusammenfassung	585
Literaturverzeichnis	586
Figurenerklärung	587

Einleitung.

Im folgenden wird, im Anschluß an eine mir von meinem verehrten Lehrer, Hofrat Prof. Dr. H. Molisch, gegebene Anregung, die bisher noch nicht bekannte Keimungsgeschichte der Pirolaceen zu studieren, ein kleiner Beitrag zur Biologie dieser interessanten Pflanzengruppe geliefert. Außerdem gebe ich auch einige Beobachtungen anatomischer und chemischer Natur wieder. Bevor ich jedoch zu meinem eigentlichen Thema übergehe, spreche ich Herrn Hofrat Molisch sowie den Herren Prof. O. Richter und Dr. G. Klein für ihre weitestgehende Unterstützung meiner Arbeit den wärmsten Dank aus.

I. Die Fortpflanzung einiger *Pirola*-Arten.

A. Literatur.

Irmisch (1855) gibt an, daß er die Keimung der Pirolaceen nicht kenne, doch liefert er eine genaue Beschreibung der vegetativen Fortpflanzung von *P. secunda* und *P. uniflora*. Er betont als erster den auffallenden Unterschied in den unterirdischen Organen der letztgenannten Art und denen aller übrigen Pirolaceen und stellt *P. secunda* und *P. uniflora* einander gegenüber. Bei der ersteren, die er als Vertreter der Gruppe: *P. secunda*, *chlorantha*, *minor*, *media* und *rotundifolia*, die sich diesbezüglich alle gleich verhalten, wählt, wird die vegetative Fortpflanzung durch weithin im Boden kriechende unterirdische Achsen besorgt. Bei *P. uniflora* dagegen fand er regelmäßig an den Wurzeln, die er an ihrem anatomischen Bau als solche erkannte, Adventivknospen, durch die allein die vegetative Fortpflanzung erfolgt, da diese Art keine Rhizome besitzt. Er fand auch einige Pflänzchen von *P. secunda*, deren Stamm direkt in eine Hauptwurzel übergang, die sich also nicht aus einem Rhizom entwickelt hatten, und betrachtete sie als Keimpflänzchen; sie hatten alle schon mehrere Blätter entwickelt und es gelang ihm nicht, jüngere Stadien aufzufinden. Er nahm an, daß sich bei der Keimung von *P. secunda* aus dem Samen zuerst ein Stämmchen bildet; für die Keimung von *P. uniflora* fehlten ihm alle Anhaltspunkte.

1889 schreibt Drude in seiner Monographie der Pirolaceen, es sei wahrscheinlich, daß sich die jüngeren Keimpflänzchen ohne CO₂-Assimilation, nur mit »Wurzelzersetzungstätigkeit« ernähren und bedauert, daß es bisher noch nicht gelungen sei, die Samen zur Keimung zu bringen oder einwandfreie jüngere Keimungsstadien in der Natur aufzufinden. Bezüglich der Wurzel-adventivknospen von *P. uniflora* verweist er auf Irmisch.

Von Velenovsky erschien im Jahre 1892 eine mir nicht zur Verfügung stehende Arbeit »Über die Biologie und Morphologie der Gattung

Monesis«, deren Ergebnisse jedoch in seiner späteren, im Jahre 1905 erschienenen Abhandlung »Über die Keimpflanzen der Pirolaceen« mitgeteilt werden. Sie beziehen sich vor allem auf die unterirdischen Organe der *P. uniflora* (*Monesis*), denen er, da sie morphologisch nicht einer Wurzel, anatomisch nicht einem Rhizom gleichzusetzen sind, den neuen Namen »Prokaulom« gab. Auch hat er nach seiner Meinung solche Prokaulome frei in der Erde lebend, ohne Zusammenhang mit oberirdischen Pflanzenteilen, gefunden. In der zweiten Arbeit spricht er zunächst von seinen Keimungsversuchen, die er u. a. auch im Walde, an den natürlichen Standorten der Mutterpflanze, vornahm und die nie zu einem Resultat führten. Ferner beschreibt er Keimpflanzen von *P. secunda*, deren er ein einziges Mal mehrere an ein und demselben Orte fand. Sie besaßen schon sämtlich mehrere voll entwickelte Blätter, zum Teil sogar schon in zwei Stockwerken übereinander, so daß er annehmen mußte, sie seien ein- bis zweijährig: jüngere Stadien oder überhaupt noch mehr Keimpflänzchen aufzufinden, gelang ihm nicht, obwohl er während zweier Monate unzählige Standorte danach absuchte. Er beschreibt Pflänzchen von *P. secunda*, die sich aus abgerissenen Wurzeln endogen entwickelt haben und die sich von Keimpflanzen durch ihre bedeutende Größe und Üppigkeit und durch die Dicke und dunkle Farbe der Wurzel, aus der sie entspringen, unterscheiden. Übrigens hat auch schon Irmisch solche aus Adventivknospen an abgerissenen Wurzeln hervorgegangene Pflanzen gefunden und beschrieben. Was zu der Annahme führen könnte, daß es sich bei den von Velenovsky gefundenen Keimpflänzchen nicht wirklich um solche, sondern nur um aus Wurzeladventivknospen hervorgegangene Pflanzen handle, ist die Tatsache, daß der oberirdische Stamm nie direkt in die Wurzel übergeht, sondern an der Übergangsstelle stets eine Anschwellung vorhanden ist und es manchmal so aussieht, als ob der Stamm seitlich aus der Wurzel hervorgebrochen wäre. Jedoch ist in solchen Fällen das obere Ende der Wurzel immer unverletzt, wodurch der Verdacht, daß es sich um aus abgerissenen Wurzeln hervorgegangene Pflänzchen handle, hinfällig wird. Gerade auf diese Art des Hervorbrechens des Stammes aus der Wurzel stützt Velenovsky seine Hypothese über den Verlauf der Keimung, denn obwohl seine diesbezüglichen Annahmen ja recht einleuchtend sind, kann man sie doch nur als Hypothese bezeichnen, da er, ebenso wenig wie jemand anderer vor oder nach ihm, jemals ein jüngeres Keimungsstadium beobachtet hat und es kann nicht genug hervorgehoben werden, daß die ersten drei der seiner Arbeit beigegebenen Abbildungen jugendlicher Keimungsstadien nicht nach der Natur gezeichnet, sondern reine Schemen seiner Hypothese sind.

Danach verläuft die Keimung von *P. secunda* folgendermaßen: zuerst entwickelt sich aus dem Samen ein unterirdischer, bleicher, zylindrischer Körper, der nach unten zu eine Wurzelhaube ausbildet und ein Prokaulom vorstellt. Hat dieses eine gewisse Länge erreicht, so bricht aus seinem oberen Ende endogen eine Knospe hervor, die sich zu einer Pflanze entwickelt, die dann später, oberhalb der Insertionsstelle des Stammes, aus diesem

entspringende, gewöhnliche Rhizome entsendet. Etwas anders stellt er die Keimungsgeschichte von *P. uniflora* dar; nur allein auf der Tatsache fußend, daß er einmal ein Prokaulom ohne Zusammenhang mit einer Pflanze fand, schreibt er folgendes:

»Aus dem Samen der *Monesis* keimt ein ähnlicher ungegliederter Körper, welcher sich aber bipolar nicht entwickelt, sondern sich nach allen Richtungen hin unregelmäßig verzweigt und fadenförmig verlängert. So entsteht ein Geflecht von fadendünnen Ausläufern, welche als selbständiger Organismus in der Humuserde saprophytisch vegetieren. Ein solches Fadengeflecht habe ich wirklich beobachtet und schon im Jahre 1892 abgebildet. Es ist ein wurzelartiges Prokaulom, welches von dem (hypothetischen! F.) der *P. secunda* dadurch abweicht, daß es lange lebt, sich fortwährend verzweigt und die Aufgabe der vegetativen Vermehrung der Pflanze übernimmt, dieselbe Aufgabe, welche bei der *P. secunda* die weitkriechenden Rhizome versehen.«

Danach teilt er die Entwicklung einer *P. uniflora* in zwei Generationen ein, eine unterirdische ungeschlechtliche und eine oberirdische geschlechtliche und zieht Parallelen mit dem Generationswechsel der Muscineen, indem er das Prokaulom mit einem Protonema vergleicht. Sollte das nicht zu weit gegangen sein, wenn man bedenkt, daß all das auf der Beobachtung eines einzigen freilebenden Prokauloms basiert, das vielleicht doch nur durch Abreißen von einer oberirdischen Pflanze entstanden ist?

Auch Goebel erwähnt in seiner Organographie das Wurzelsystem von *P. uniflora*. Doch ist es mir nicht bekannt, ob er sich dabei auf die Angaben Velenovsky's stützt oder eigene Beobachtungen mitteilt. In dem Abschnitt »Freilebende Wurzeln« schreibt er:

»Auch finden sich Wurzelsysteme, die offenbar jüngere Stadien darstellen und noch keine Sprosse entwickelt haben. Es ist die Keimung leider noch unbekannt. Wahrscheinlich aber geht aus dem ungegliederten Embryo des keimenden Samens nicht wie sonst ein beblätterter und bewurzelter Sproß, sondern unter Verkümmern des letzteren nur ein saprophytisch lebendes Wurzelsystem hervor, an dem dann später endogene Sprosse entstehen.«

Kinzel gibt in seiner Arbeit über Lichtkeimung an, es scheine ihm nach dem Verlauf seiner Versuche unwahrscheinlich, daß die *Pirola*-Arten ohne Pilzwirkung keimten. In seinem Buch »Frost und Licht als beeinflussende Kräfte bei der Samenkeimung« sagt er, daß sich Samen von *P. uniflora* und *P. secunda* während eines vier Jahre dauernden Keimungsversuches im Dunkeln unverändert erhalten hätten.

»Die sehr kleinen Samen dieser Familie waren trotz mannigfaltiger Versuche auf keine Weise zum Keimen zu bringen und da so ziemlich alle Möglichkeiten in der Behandlung berücksichtigt wurden, muß man wohl annehmen, daß sie, wie die Samen der Orchidaceen, nur in Symbiose mit den dazugehörigen Wurzelpilzen sich zu entwickeln vermögen.«

B. Eigene Beobachtungen.

1. Eigene Beobachtungen in der Natur.

In den Wäldern in der Umgebung von Payerbach (Niederösterreich) kommen *P. secunda* und *P. chlorantha* massenhaft vor, nicht ganz so häufig *P. minor*. Ich wählte zum Suchen nach Keimlingen Stellen aus, wo die Pflanzen dicht standen und möglichst viele vertrocknete Fruchtstände vom vorigen Jahr zu sehen waren. Denn an solchen Stellen, wo oft im Bereich weniger Quadratdezimeter viele Fruchtstände stehen, müssen im vorhergehenden Herbst viele Tausende von Samen ausgestreut worden sein. Ich nahm meine Nachforschungen in der Zeit von Ende April bis Anfang Juni vor, denn ich dachte, daß die Keimung um diese Zeit schon eingetreten sein müsse und ich die jüngsten Stadien finden werde. Aber obwohl ich oft und an den verschiedensten Standorten stundenlang Nachgrabungen vornahm und den Boden auf weite Strecken hin mit der Lupe durchforschte, fand ich nie etwas anderes als vollkommen unversehrte Samen, die ganz unverändert, so wie sie im Herbst ausgestreut worden waren, im Boden lagen. Auch die mikroskopische Untersuchung zeigte keine Veränderung gegenüber trocken in einer Schachtel aufbewahrten Samen.

Da diese Nachforschungen zu keinem Ziele führten, versuchte ich, wenigstens die von Irmisch und Velenovsky beschriebenen älteren Keimpflänzchen zu finden. Zu diesem Zwecke grub ich möglichst vereinzelt stehende kleine Exemplare aus, die eben erst aus der Erde herauskamen und bei denen kaum anzunehmen war, daß sie durch Rhizome mit anderen in Verbindung ständen. Ein einziges Mal fand ich ein Pflänzchen von *P. chlorantha*, das mit den aus der Literatur bekannten Keimpflänzchen übereinstimmte, in allen anderen Fällen entsprang die Pflanze stets aus einem Rhizom, das oft zu meterweit entfernten älteren Pflanzen hinleitete oder an einem Ende abgestorben war. Meist war es reich verzweigt und jeder Ast endete entweder mit einer älteren Pflanze oder mit einer Knospe, die schon bereit war, über den Boden hervorzutreten. Man sieht stets ganze Kolo-

nien gleich alter Pflanzen, was daher kommt, daß viele Rhizomverzweigungen zu gleicher Zeit angelegt werden und dann auch wieder zu gleicher Zeit ihre in eine Knospe ausgehenden Enden über den Boden erheben. Die Entwicklung des Rhizoms ist besonders bei *P. secunda* eine sehr üppige; Kolonien von nur drei oder vier Pflanzen sind verhältnismäßig selten. Einmal zählte ich in einer großen Kolonie weit über 100 Pflanzen, die alle miteinander in Verbindung standen, und ich glaube, daß man bei sorgfältigen Nachgrabungen finden wird, daß so große Kolonien gar nicht selten sind und daß viel mehr Pflanzen durch gemeinsame Rhizome verbunden sind, als es bei oberflächlicher Betrachtung den Anschein hat. Die Rhizome reichen auch zur Anlage von weit entfernten Kolonien vollständig aus, so daß die Verbreitung durch Samen als überflüssig erscheinen könnte.

Die Untersuchungen über *P. uniflora* nahm ich im Semmeringgebiet vor. Bei meinen wiederholten Nachgrabungen daselbst fand ich weder freilebende Prokaulome, wie Velenovsky eines gefunden haben will, noch sonstige Keimungsstadien. Die Pflanzen stehen immer in Kolonien beisammen und sind durch dünne Wurzelfäden miteinander verbunden, die beim Ausgraben sehr leicht abreißen.

Dagegen scheint mir die folgende Beobachtung von größter Bedeutung zu sein: ich kultivierte in Blumentöpfen je einige Pflanzen von *P. uniflora* und *P. chlorantha*, die ich zur Blütezeit an ihrem Standort mit einem größeren Erdballen ausgegraben hatte und die dann später im Topf Früchte trugen und ihre Samen austreuten. Ende Oktober durchsuchte ich die Erde eines dieser Töpfe von *P. uniflora*, um zu sehen, was aus den Samen geworden sei. Dabei fand ich ein bleiches, walzenförmiges Gebilde (Fig. 1) von ungefähr 15 mm Länge und einem größten Durchmesser von 3 mm. Aus dem einen dickeren Ende brach eine winzige Knospe hervor, am entgegengesetzten viel dünneren Ende waren die Kanten so scharf, daß es fast wie abgehackt erschien; es war jedoch unverletzt. Dieses Gebilde war der Länge nach mit sechs langen, dünnen, ziemlich reichlich verzweigten Wurzeln besetzt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß der ganze

walzenförmige Körper den Bau einer Wurzel besaß; er setzte sich zusammen aus einem dünnen, regelmäßig triarch gebauten Zentralzylinder, einem sehr breiten, mit großen Stärkekörnern zum Zerplatzen vollgepfropften Rindenparenchym und einer Epidermis von normaler Breite. Diese hatte keine Wurzelhaare und war von demselben braun gefärbten, mit Schnallenbildungen versehenen Pilz in derselben Weise, wie ich es in dem Kapitel über die Mykorrhiza für die Wurzeln von *P. uniflora* beschreibe, umhüllt. Ein Eindringen der Hyphen in das Innere der Zellen habe ich nicht beobachtet. Es wechselten, ebenso wie bei den Wurzeln von *P. uniflora*, längere mit weniger häufigen kürzeren Epidermiszellen ab. Auffallend war nur, daß die Stärkekörner des Rindenparenchyms ganz unvergleichlich größer waren als die normaler Wurzeln.

Die Wurzeln dieses merkwürdigen Körpers waren sehr reichlich mit Haaren besetzt und besaßen eine spärliche Pilzumhüllung. Sie enthielten Stärkekörner von derselben Größe und vom selben Aussehen wie normale *Pirola*-Wurzeln. Besondere Verschiedenheiten gegenüber normalen Wurzeln von *P. uniflora* habe ich nicht konstatiert. Nach meinen Beobachtungen bin ich zu der Überzeugung gelangt, daß ich es hier wirklich mit einer jungen *Pirola*-Pflanze zu tun hatte. Die beste Erklärung für die Entwicklung eines verhältnismäßig so großen und so reich mit Reservestoffen versehenen Körpers aus dem mikroskopisch kleinen Samen ist die Annahme einer saprophytischen Lebensweise unter Mitwirkung des Pilzes, ähnlich wie sie Noël und Burgeff für Orchideenkeimlinge beschrieben haben. Ich kann nicht sagen, wie sich dieses Gebilde weiterentwickelt; am wenigsten Schwierigkeiten begegnet die Annahme, daß, nach Entwicklung oberirdischer Assimilationsorgane, der ganze Körper, nachdem ihm sämtliche Reservestoffe entzogen wurden, ähnlich wie verbrauchte Kotyledonen, unter Einschrumpfen zugrunde geht.

Die Auffindung dieses merkwürdigen Gebildes steht mit der Theorie Velenovsky's, daß sich bei der Keimung von *P. uniflora* zuerst ein dünnes, fadenförmiges Prokaulom entwickle, in Widerspruch. Dagegen stimmt sie auffallend gut mit seinem hypothetischen Prokaulom von *P. secunda* überein

und hätte ich diesen unterirdischen Körper in einem Topf dieser *Pirola*-Art gefunden, er wäre die schönste Bestätigung der Velenovsky'schen Hypothese gewesen. So aber, als Prokaulom von *P. uniflora*, verlangt er nach einer anderen Erklärung, die in befriedigender Weise erst nach Auffindung älterer Keimungsstadien wird gegeben werden können.

Ich glaube meine Untersuchungen mit genügender Gewissenhaftigkeit vorgenommen zu haben, um sagen zu können, daß Keimpflanzen der von mir untersuchten *Pirola*-Arten zu den allergrößten Seltenheiten gehören und daß die genannten Pflanzen mit der vegetativen Fortpflanzung durch Rhizome, respektive Adventivknospen an den Wurzeln ihr reichliches Auslangen finden könnten und nicht auf die Verbreitung durch Samen angewiesen zu sein brauchten.

Als Beweis dafür möchte ich noch erwähnen, daß ich einmal im August im Salzkammergut einen sehr schattigen Wald betrat, dessen Boden mit *P. minor* reich bewachsen war. Doch sah ich keine einzige Pflanze, die diesjährige Blütenstände, vorjährige Fruchtstände oder Blütenknospen für das nächste Jahr aufgewiesen hätte. (Bei den Pirolaceen sind nämlich im Spätsommer gewöhnlich die Frucht-, respektive Blütenstände von drei Vegetationsperioden zugleich sichtbar.) In diesem Falle hatte ich also den Beweis, daß von allen Pflanzen des Waldes keine oder doch nur eine verschwindend geringe Anzahl, die ich übersehen haben kann, im Vorjahr geblüht hatte, keine in diesem Jahr und daß im nächsten Jahr keine blühen würde. Es wurden also nach meiner Beobachtung an der bezeichneten Stelle bereits durch mindestens zwei Jahre keine Samen ausgebildet und doch war alles übersät mit jungen Pflanzen. Ob auch in den vorhergehenden Jahren keine Samen zur Entwicklung gekommen waren, weiß ich nicht, doch ist anzunehmen, daß die überaus geringe hier herrschende Lichtintensität auch früher schon der Ausbildung der Blüten ungünstig war. Es kann sich also eine ganze Decke von Pirolaceen ohne Mithilfe der Samen nur durch vegetative Rhizomknospen dauernd in größter Üppigkeit erhalten.

Es erscheint mir auch als sehr wahrscheinlich, daß in den vielen anderen Fällen, in denen Samen ausgebildet werden, nur ein kleiner Bruchteil davon keimungsfähig ist, sei es, daß die Keimfähigkeit im Laufe der Zeit rückgebildet wurde, sei es, daß sie nie in größerem Ausmaß vorhanden war. Ich möchte annehmen, daß sich unter der ungeheuren Menge der in einer Kapsel herangereiften Samen kaum je ein zur Weiterentwicklung befähigter findet. Dazu veranlaßt mich die Tatsache, daß an den beiden Stellen, wo ich den auf p. 563 erwähnten Keimling von *P. chlorantha* und den im vorhergehenden beschriebenen von *P. uniflora* entdeckte, bestimmt eine Anzahl Samen derselben *Pirola*-Arten sich unter den gleichen äußeren Bedingungen befanden; warum war also von dieser großen Menge nur je ein einziger Same zur Weiterentwicklung gelangt? Das ließe sich am besten durch Annahme einer besonderen natürlichen Anlage, sei es anatomischer oder chemischer Natur, erklären, die zur Auslösung der Keimung vorhanden sein müßte und die der Mehrzahl der Samen fehlen könnte. Außerdem scheinen selbst die keimungsfähigen Samen noch besonderer äußerer Bedingungen zu bedürfen, die sich nicht überall verwirklicht finden: Vorhandensein eines bestimmten Pilzes, vielleicht noch kombiniert mit besonders extremen Beleuchtungs-, Feuchtigkeits- und anderen Verhältnissen.

Fassen wir all dies zusammen, so kann es nicht weiter wundernehmen, daß die Auffindung von *Pirola*-Keimlingen mit sehr großen Schwierigkeiten verbunden ist und selbst bei angestrengtestem Suchen nur in Ausnahmefällen gelingt.

2. Keimungsversuche.

Die Keimungsversuche wurden vorgenommen teils mit Samenmaterial von *P. minor*, das ich von Haage und Schmidt aus Erfurt bezog, teils mit Samen von *P. uniflora* und *P. chlorantha*, die ich selbst gesammelt hatte. Es wurden immer zwei parallele Serien von Versuchen, eine im Dunkeln und eine im Licht, aufgestellt. Ausgesät wurde auf Filtrierpapier, Heideerde, Moorerde, Torf, humusreiche Walderde vom Standort der betreffenden *Pirola*-Art und endlich streute ich

auch Samen in Pilzkulturen, die von einer *Pirola*-Wurzel gewonnen worden waren. Die Versuche wurden zu den verschiedensten Jahreszeiten bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen. Sie blieben sämtlich erfolglos. Die Samen waren entweder noch nach mehreren (bis zu neun) Monaten unversehrt und unverändert erhalten oder sie waren der Fäulnis anheimgefallen und nicht mehr auffindbar.

II. Anatomie des Samens.

Die Samen der *Pirola*-Arten gehören zu den kleinsten, die wir überhaupt kennen und werden nur von denen einiger Orchidaceen an geringem Gewicht und geringer Größe übertroffen. Die verhältnismäßig großen kapselartigen Früchte enthalten Unmengen des staubförmigen Samens; doch geht mit der massenhaften Produktion ein häufiges Verkümmern des einzelnen Samens Hand in Hand.

Ein beträchtlicher Teil der Samen bleibt auf einer unvollkommenen Entwicklungsstufe stehen oder erleidet anderweitige Mißbildungen und Verkümmern, so daß sich die Unfähigkeit zur Keimung, die meiner Meinung nach dem Gros der Samen zukommt (siehe p. 567) bei manchen auch schon rein äußerlich dokumentiert.

Der normale Samen (Fig. 2) besteht aus der Testa, dem sehr ölreichen Endosperm und dem darin eingebetteten ungliederten Embryo. Die Testa setzt sich aus großen, langgestreckten Zellen, die sehr schöne, regelmäßige Netzverdickungen aufweisen, zusammen und umhüllt in Form eines weiten Mantels den rundlichen Endospermkörper. Nach oben und unten hin ist sie in einen langen Fortsatz ausgezogen, der als Flugorgan dient, da durch ihn das spezifische Gewicht des Samens wesentlich herabgesetzt und seine Oberfläche vergrößert wird. In der Querrichtung liegt die Testa dem Endospermkörper dichter an. Ihre Zellen sind in seiner Nähe mit je einem spitzen, über die Länge der ganzen Zelle sich erstreckenden Vorsprung versehen. Dadurch entsteht bei Samenquerschnitten (Fig. 4) ein sternförmiges Bild; die Spitzen des Sternes werden durch die vorspringenden Längsrippen gebildet,

die Einbuchtungen entstehen dadurch, daß die Zelle in der Mitte zwischen zwei solchen Vorsprüngen in sich zusammengefallen ist und sich dem Endospermkörper ganz dicht anlegt.

Bei Untersuchung des ganzen unversehrten Samens ist es schwer, einen Einblick in die Gliederung des Endospermkörpers zu erhalten, da die darüberliegende Testa die Beobachtung erschwert. Bessere Bilder erhält man nach Aufhellung mit KOH, doch ließen sie auch dann noch zu wünschen übrig. Am besten eigneten sich zur Untersuchung Samen, deren Testa durch einen eine halbe Stunde währenden Aufenthalt in Chromschwefelsäure, eventuell unterstützt durch schwaches Erwärmen, aufgelöst worden war, so daß der Endospermkörper volikommen frei lag. Dieser wurde nach Auflösung der Testa sofort in Wasser übertragen, um ein weiteres Einwirken der Chromschwefelsäure unmöglich zu machen. Es wurden auch Mikrotomschnitte nach folgender Methodik angefertigt: die trockenen Samen wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten, mit Gentianaviolett gefärbt und in Kanadabalsam eingeschlossen. Diese Methode hatte gegenüber der Behandlung mit Chromschwefelsäure den Vorteil, daß die Kerne als leuchtend blau gefärbte Körper sichtbar wurden.

In der älteren Literatur wird der ganze Endospermkörper für den Embryo gehalten und man meinte, einen endospermlosen Samen vor sich zu haben. Doch in der neueren Literatur ist meistens schon vom Endospermkörper die Rede, aber es fehlt jede Angabe, welcher Teil desselben als Embryo zu betrachten sei. Nach meinen Beobachtungen besteht der Endospermkörper (Fig. 3) aus einem einfachen Mantel etwas abgerundeter, unregelmäßig prismatischer Zellen, die meist in der Längsrichtung des ganzen Körpers etwas gestreckt sind. Die mit Gentianaviolett gefärbten Mikrotomschnitte wiesen ziemlich große runde Kerne auf. Am oberen und am unteren Ende sieht man eine dunkle Masse dem Endosperm außen anliegen (Fig. 2). Es dürfte das je eine abgestorbene und zusammengefallene Zelle sein, wie sie auch Koch regelmäßig dem Endosperm von *Monotropa* anhaften sah. Das Innere des Endospermkörpers ist erfüllt mit kleinen, dünnwandigeren Zellen, die gegen den äußeren Mantel hin scharf abgegrenzt

sind, dagegen miteinander einen einheitlichen runden Körper bilden, den man wohl als Embryo ansprechen muß. Auch die Zellen dieses Körpers enthalten große Kerne, die bei Färbung mit Gentianaviolett deutlich sichtbar werden. Das Endosperm ist vollgepfropft mit fettem Öl, das bei eventuellen Verletzungen in Form von größeren und kleineren stark lichtbrechenden Kugeln massenhaft herausquillt.

Untersucht wurden Samen von *P. minor*, *secunda*, *chlorantha* und *uniflora*, die einander alle sehr ähnlich sind. *P. uniflora* unterscheidet sich von den anderen untersuchten Arten dadurch, daß der Samen im ganzen länger und schmaler gebaut und heller gefärbt ist. *P. secunda* und *P. chlorantha* weisen eine feinere Netzstruktur der Testa auf, die nicht so in die Augen fallend ist wie die von *P. minor* und *P. uniflora*. Im übrigen stimmen alle von mir untersuchten Arten in den wesentlichen Merkmalen miteinander überein.

III. Die Mykorrhiza.

A. Literatur.

Irmisch spricht schon im Jahre 1855 von den verhältnismäßig großen, dünnwandigen Epidermiszellen der *Pirola*-Wurzeln, die ebenso wie die Wurzeln mancher Orchideen eine zusammengeballte dunkle Masse enthalten, über deren Entstehung und Zusammensetzung er sich aber nicht weiter äußert. Auch beobachtete er, daß die Wurzeln von *P. secunda* häufig mit einem schwärzlichen Pilz umspinnen sind, ahnte aber nicht den Zusammenhang zwischen diesem und den zusammengeballten dunklen Massen im Innern der Epidermiszellen. Auch maß er diesen Beobachtungen weiter keine Bedeutung bei.

Später, 1887, erwähnt Frank eine Bemerkung Kerner's aus dem Jahre 1886: »Die Wurzelhaare der Pirolaceen werden durch einen Pilzmantel ersetzt.« Dem pflichtet er aber nicht bei, sondern stellt das Vorhandensein einer Mykorrhiza bei den Pirolaceen überhaupt in Abrede. In derselben Arbeit liefert er eine Beschreibung der Ericaceenmykorrhiza, die mit der von mir bei *Pirola* beobachteten große Ähnlichkeit hat.

In der späteren Literatur ist die Pirolaceenmykorrhiza schon allgemein bekannt. 1899 erschien eine Arbeit von Kramař, die eine genaue Beschreibung der Mykorrhiza von *P. rotundifolia* darstellt. Er vergleicht sie mit der von *P. minor*, die er als eine koralloide bezeichnet. Dieser Behauptung muß ich aber widersprechen, da ich die Wurzeln von *P. minor* immer der ganzen Länge nach verpilzt fand und nicht nur an den von ihm als dunkler gefärbt abgebildeten Spitzen. Die dunklere Färbung der Wurzelspitzen konnte ich hie und da beobachten, doch bildet sie gewiß kein konstantes Merkmal und scheint mit der Mykorrhiza nichts zu tun zu haben. Auch sind die Nebenwurzeln nur selten so kurz, daß man die Form der Mykorrhiza als koralloid bezeichnen könnte. Die Mykorrhiza von *P. rotundifolia* konnte ich leider mangels des nötigen Materials nicht untersuchen, doch glaube ich, daß auch hier die Beobachtung Kramař's, daß die keulenförmig verdickten Wurzelenden die alleinigen Träger der Mykorrhiza seien, auf einem Irrtum beruht; ich fand nämlich auch hie und da bei *P. secunda*, häufiger und stärker ausgebildet bei *P. chlorantha*, keulig angeschwollene Wurzelenden. Sie erwiesen sich als besonders stark vom Pilz befallen und hatten daher besonders stark vergrößerte Epidermis- und oft auch vergrößerte Rindenparenchymzellen. Sie stellten meist schon im Absterben begriffene Teile einer Wurzel dar, die aber stets, wenn auch viel schwächer, doch auch in ihrem ganzen übrigen Verlauf verpilzt war. Es liegt daher nahe, dasselbe auch für die Wurzeln von *P. rotundifolia* anzunehmen, besonders da sich der Irrtum Kramař's so erklären ließe, daß seine Untersuchungen, vielleicht ebenso wie die von Frank, zu einer ungünstigen Jahreszeit vorgenommen wurden (im Frühjahr oder Frühsommer), wo die Mykorrhiza manchmal noch wenig entwickelt ist und bei flüchtiger Beobachtung nur an den verdickten Stellen durch ihre besondere Üppigkeit auffällt. Auch Irmisch fand schon hie und da die Wurzeln von *P. secunda* und in höherem Grade die von *P. rotundifolia* keulig verdickt. *P. chlorantha* hat er nicht untersucht. Kramař stellt ferner die Behauptung auf, daß es bei *P. minor* keine hypertrophierten Epidermis-

zellen gibt; ich muß dagegen sagen, daß eine Hypertrophie wohl vorhanden, aber nicht so auffallend wie bei den anderen Arten ist. Gegenüber der ungeheuren Breite der Zellen, wie sie Kramář für *P. rotundifolia* abgebildet hat, ist die Hypertrophie von *P. minor* allerdings eine verschwindende. Nach den Abbildungen von Kramář ist die Breite der Epidermiszellen bei *P. rotundifolia* schon im nicht infizierten Stadium eine viel größere als bei den von mir untersuchten Arten. Verbreitern sich also diese Zellen infolge der Infektion um dasselbe Vielfache ihrer ursprünglichen Ausdehnung, wie z. B. die viel schmäleren von *P. uniflora*, so resultiert daraus für *P. rotundifolia* eine ganz bedeutend größere Breite. Die Details seiner Beschreibung der Mykorrhiza von *P. rotundifolia* kann ich nicht beurteilen, da mir, wie gesagt, das nötige Vergleichsmaterial fehlte. Im großen ganzen zeigt sich manche Ähnlichkeit mit der der anderen Arten.

Stahl gibt in seiner Arbeit aus dem Jahre 1900 an, daß er zur Blütezeit die Wurzeln der Pirolaceen unverpilzt fand, im Herbst dagegen eine reichliche Entwicklung der Mykorrhiza beobachten konnte. Im übrigen verweist er auf die Arbeit von Kramář.

B. Eigene Beobachtungen.

Das Untersuchungsmaterial stammte größtenteils aus Payerbach, zum Teil aber auch aus dem Semmeringgebiet, vom Leithagebirge, aus der Umgebung von Wiener-Neustadt und aus Neulengbach (Niederösterreich). Die an den verschiedenen Orten gesammelten Pflanzen wiesen keinerlei auffallende Unterschiede auf.

Als Untersuchungsmethode eignete sich am besten die folgende:

Die Wurzeln wurden in Kaiser'scher Mischung (10 Teile Sublimat, 3 Teile Eisessig, 100 Teile Wasser) fixiert, nach 24 Stunden in 50 % Alkohol übertragen, der zwecks gründlicher Auswaschung mehrmals gewechselt wurde. Wurden die Wurzeln nicht sofort untersucht, so verblieben sie einstweilen im Alkohol. Längs- und Querschnitte durch dieselben wurden mit einer 1 %-Lösung von Methylenblau in 50 % Alkohol

gefärbt, mit Alkohol ausgewaschen, durch Übertragen in immer höherprozentige Alkohole bis zum absoluten entwässert in Xylol übertragen und endlich in Kanadabalsam eingeschlossen. Mikrotomschnitte ergaben kaum bessere Bilder als mit der Hand verfertigte, weshalb ich die bequemere Methode der Handschnitte beibehielt.

Die Mykorrhiza der *Pirola*-Arten ist eine endotrophe. Sie ist für die von mir untersuchten Arten, das sind: *P. uniflora*, *chlorantha*, *secunda* und *minor*, obligatorisch, denn es gelang mir nie, ganze pilzfreie Wurzeln, geschweige denn solche Pflanzen aufzufinden. Die meisten Wurzeln waren bei der Untersuchung schon ganz vom Pilz durchsetzt; nur bei *P. uniflora* konnte ich ausnahmsweise auch die ersten Stadien der Infektion beobachten.

Vor dem Eintreten des Pilzes zeigt die Wurzel von *P. uniflora* ein ganz normales Aussehen. Die Epidermiszellen haben kaum eine größere Breite als die Zellen der darunterliegenden Rindenparenchymschichte. Ihre Länge ist sehr verschieden: langgestreckte Zellen wechseln mit weniger zahlreichen ebenso langen als breiten ab. Alle weisen kleine, scharf umgrenzte Kerne auf. Wurzelhaare sind an den meisten Wurzeln gar nicht, an einigen wenigen sehr reichlich vorhanden. Solchen Wurzeln nähern sich die braunen, mit Schnallen versehenen Hyphen und legen sich an ihre Oberfläche an (Fig. 5). Sie folgen den Konturen der Epidermiszellen, indem sie sich in die Spalte, die je zwei aneinandergrenzende Zellwände bilden, hineinlegen. So überziehen sie nach und nach die ganze Oberfläche der Wurzel mit einem weitmaschigen, braunen Netz. Dann beginnen die Hyphen an vielen Stellen zugleich ins Innere der Wurzel vorzudringen. Das geschieht entweder interzellulär oder zwar im Inneren der Zelle, aber ganz dicht an die Wand angepreßt. Ist einmal dieses Stadium der Verpilzung eingetreten, so reagiert die Wurzel darauf mit einem starken Dickenwachstum der Epidermiszellen (Fig. 6), das im weiteren noch zunimmt. Wie ich durch Messungen konstatiert habe, wird zum Schluß die vier- bis fünffache Breite der noch nicht infizierten Zelle erreicht. Auch der Kern vergrößert sich sehr stark und der Nucleolus wird als dunkler gefärbter Körper deutlich sichtbar. In diesem Stadium ist von Wurzelhaaren nichts mehr zu sehen. Ist der Pilz nun an der an das Rindenparenchym grenzenden Zellwand angekommen, so legt er sich ihr an und beginnt parallele Schichten von Hyphen an ihr abzusetzen. Diese sind farblos, viel dünner als die außerhalb der Zelle befindlichen, stärker septiert, zeigen keinerlei Inhaltskörper und haben stark lichtbrechende Wände. Die einzelnen Schichten sind dicht aneinandergepreßt und die hie und da davon abzweigenden Hyphen bilden die Angriffsfläche für neue Schichten. Nach und nach wird die ganze Zelle, immer von der dem Rinden-

parenchym zugekehrten Seite der Zelle aus fortschreitend, mit Hyphen erfüllt (Fig. 7), durch die der Kern nur mehr als undifferenzierte, dunkle Masse durchschimmert. Nun beginnt auch schon der Zerfall der Hyphen, sie werden undeutlich, ballen sich zu Knäueln zusammen und bilden endlich einen braun gefärbten toten Inthaltskörper der Zelle, deren Kern auch nicht mehr auffindbar ist und die überhaupt keinen lebenden Inhalt mehr besitzt (Fig. 8); sie ist abgestorben und wird manchmal mit der Zeit abgestoßen.

Das ist der Verlauf der Verpilzung, wie er sich im wesentlichen auch bei den anderen von mir untersuchten Arten abspielt. Ein wichtiger Unterschied zwischen *P. uni-flora* und den anderen Arten ist der, daß ich an den anderen Arten niemals Wurzelhaare beobachten konnte, während sie an den noch nicht oder schwach infizierten Wurzeln von *P. uni-flora* in einzelnen Fällen reichlich vorhanden waren. Ich möchte diesen Umstand ausdrücklich hervorheben, da ich in der Literatur die Ansicht allgemein vertreten fand, daß die Pirolaceen, ebenso wie die Ericaceen, durchwegs frei von Wurzelhaaren seien. Man kann allerdings auch bei *P. uni-flora* nur im Frühjahr, und auch dann nur selten, Wurzelhaare beobachten, da sie nach der Infektion sofort bis auf den letzten Rest verschwinden und auch bei nicht infizierten Wurzeln selten sind. Wahrscheinlich bringen die im Sommer und Herbst neu gebildeten Wurzeln, die von dem zu dieser Jahreszeit im ganzen Wurzelsystem üppig wuchernden Pilz sofort bei ihrer Entstehung bis in die jüngsten Gewebe an der Spitze infiziert werden, niemals mehr Haare hervor. Andererseits mögen die im Frühjahr sich entwickelnden Wurzeln, die längere Zeit steril im Boden leben und erst nach und nach vom Pilz befallen werden, zur Entwicklung der Haare genügend Zeit haben und sie vielleicht zur Wasseraufnahme notwendiger brauchen als die mit Mykorrhiza versehenen Wurzeln. Denn die Pilzhyphen bilden eine ausgiebige Kommunikation zwischen der Wurzel und dem sie umgebenden Erdreich und es neigen ja auch manche Forscher (Stahl) der Ansicht zu, daß die Mykorrhiza gewisser Pflanzen bei der Aufnahme des Wassers und der Nährsalze die fehlenden Wurzelhaare ersetze. Ohne aber auf diese Hypothesen näher einzugehen, will ich nur die Tatsache

konstatieren, daß ich an Wurzeln von *P. uniflora* nie Wurzelhaare und Mykorrhiza zugleich beobachtet habe, daß sich die beiden also gegenseitig auszuschließen scheinen, was wohl für die eben geäußerte Anschauung spricht.

Die Wurzeln von *P. chlorantha* sind, wie ich schon früher hervorhob, öfters an ihren Enden keulig angeschwollen. Das rührt von einer besonders starken Hypertrophie her, an der oft auch das Rindenparenchym teilhat. Hie und da konnte ich solche Anschwellungen, aber in geringerem Grade, auch an *P. secunda* beobachten. Bei beiden Arten waren sie meist dunkler gefärbt als die übrigen Teile der Wurzel, waren sehr brüchig und meist schon im Absterben begriffen.

Normalerweise ist die Mykorrhiza auf die Epidermiszellen beschränkt, doch kommt es manchmal, in besonders stark infizierten Wurzeln, vor, daß einzelne Hyphen in die darunterliegende Rindenparenchymschicht vordringen. In diesem Falle reagieren die Rindenzellen genau so wie die Epidermiszellen beim Eintritt der Infektion; sie werden hypertrophiert und auch ihre Kerne vergrößern sich. Doch bewegen sich Verpilzung und Hypertrophie stets in viel bescheideneren Grenzen als in der Epidermis, wie man denn überhaupt die Infektion subepidermaler Zellschichten nicht als regelmäßiges Merkmal, sondern nur als Ausnahmefall betrachten muß.

Bei den Mykorrhizen mancher anderer Pflanzen pflegen sich die Sporen des Pilzes regelmäßig in den von ihm befallenen Wurzelzellen abzulagern. Bei *Pirola* war ein solches regelmäßiges Auftreten von Sporen nicht zu konstatieren, nur hie und da ließen sich Sporen verschiedener Pilze an der Oberfläche der Wurzel und in den Epidermiszellen beobachten, doch war es niemals mit Bestimmtheit zu sagen, ob die Sporen wirklich dem Mykorrhizapilz angehörten. Einmal traten solche einer *Fusarium*-Art an der Oberfläche der Epidermiszellen massenhaft und hie und da auch in ihrem Innern auf, ein anderes Mal waren es große runde Sporen, die zu viert eine Zelle erfüllten, und wieder ein anderes Mal sah ich in mehreren Zellen dichte Haufen von kleinen gelben Sporen. Es ist mir ganz unmöglich, irgend etwas darüber auszusagen, ob eine dieser drei Sporenarten mit dem Mykor-

rhizapilz etwas zu tun hat oder ob es sich dabei nur um zufällige Parasiten handelt.

Am stärksten entwickelt pflegt die Mykorrhiza bei *P. chlorantha* und *P. uniflora* zu sein, doch ist sie auch bei *P. secunda* und *P. minor* nicht viel schwächer, nur daß bei den beiden letzteren die Hypertrophie der Epidermiszellen nicht so bedeutend zu sein pflegt. Ich hatte nie Gelegenheit, ganz sterile Wurzeln von *P. minor* zu untersuchen (vielleicht weil es solche gar nicht gibt), kann daher nicht zahlenmäßig feststellen, um das wievielfache der ursprünglichen Breite die Epidermiszellen zunehmen, doch dürfte die Zunahme wohl nicht die bei *P. uniflora* beobachtete (das Vier- bis Fünffache der ursprünglichen Breite) erreichen.

Es fiel mir auf, daß sich Schnitte durch frische, stark verpilzte Wurzeln irgendeiner *Pirola*-Art nach mehrstündigem, oft auch erst mehrtägigem Verweilen in Glyzerin manchmal schön himmelblau bis blaugrün färbten. Und zwar trat diese Färbung nur in der ersten subepidermalen Schicht und manchmal in der Endodermis auf und auch da nicht immer in allen Zellen derselben. Der ganze Zellinhalt war mit dem blauen Farbstoff durchtränkt, die Kerne speicherten ihn besonders stark. Ich meinte zuerst, daß ich es hier mit einer Gerbstoffreaktion, hervorgerufen durch die Berührung mit dem Rasiermesser, zu tun hätte. Das stellte sich aber bald als irrtümlich heraus, da auch ganze, ungeschnittene Wurzeln, die nicht mit dem Messer in Berührung gekommen waren, nach dem Einlegen in Glyzerin schöne Blaufärbungen zeigten. Auch ergab eine Prüfung mit FeSO_4 , daß wohl Gerbstoff in den Wurzeln enthalten ist, aber in den besagten Zellpartien nicht in stärkerem Ausmaß als in den anderen Geweben, so daß also kein Grund zur ausschließlichen Färbung dieser Zellen vorlag. Nun prüfte ich auf das Vorhandensein von Oxydasen, die die Färbung hätten hervorrufen können. Ich wandte die Guajak-Wasserstoffsuperoxydmethode und die Probe mit Wurster's Tetrapapier an, doch erfolgte keine Reaktion. Die chemische Zusammensetzung dieses Chromogens ist mir also nicht bekannt, doch ist es jedenfalls in die Reihe der von Molisch als Pseudoindican bezeichneten Farbstoffe zu stellen. Die Färbung

steht gewiß in ursächlichem Zusammenhang mit der Mykorrhiza, denn ich konnte sie nur an solchen Wurzeln beobachten, deren Epidermiszellen reichlich Hyphen enthielten, und stets war sie am stärksten in der an die Epidermis grenzenden Zellschichte, viel schwächer in der Endodermis.

IV. Versuche über die Kultur des Mykorrhizapilzes.

Behufs Reinkultur des Mykorrhizapilzes wusch ich *Pirola*-Wurzeln in fließendem Wasser möglichst gut ab, zerschnitt sie dann mit einem abgeflammtten Messer in wenige Millimeter lange Stücke, die ich mit einer ausgeglühten Nadel auf den Nährboden übertrug. Als solchen benutzte ich 1·5 % Agar, das mit Dekokt von *Pirola*-Pflanzen, Torf oder Pflaumen versetzt worden war. Alle Kulturen wurden in Parallelserien im Licht und im Dunkel vorgenommen. Es zeigte sich, daß bei Kultur auf den genannten Nährböden nach zwei bis drei Tagen aus den Schnittflächen der Wurzeln ganze Büschel eines dünnen, farblosen, wenig charakteristischen Pilzes hervorkamen. An den folgenden Tagen wurden die Büschel immer dichter, es sah aus, als ob jede Schnittfläche in einen dicken Pinsel überginge. Auch von den nicht angeschnittenen Partien der Wurzeln gingen einzelne Hyphenstränge aus, doch erreichten sie hier niemals solche Üppigkeit wie an den Schnittflächen. Nach seinem Aussehen konnte ich den Pilz nicht mit Bestimmtheit als den Mykorrhizapilz agnoszieren, doch scheint mir die Tatsache für seine Identität zu sprechen, daß er so reichlich aus den angeschnittenen Zellen herauswuchs, die ja sicher den Mykorrhizapilz enthielten. Leider gelang es mir nie, tadellose Reinkulturen zu erhalten, da sich besonders in den Dunkelkulturen immer Bakterien und Schimmelpilze, die den Wurzeln anhafteten, breit machten. Auch erreichten die Kulturen nie große Üppigkeit, da sie regelmäßig nach acht bis zehn Tagen das Wachstum einstellten und zugrunde gingen. Durch Überimpfen konnten sie gerettet werden, doch trat auch auf dem neuen Nährboden immer wieder nach acht bis zehn Tagen ein Stillstand im Wachstum ein. Im

allgemeinen gediehen die Lichtkulturen besser, da sie weniger durch Bakterien geschädigt wurden. Um die den Wurzeln stets anhaftenden Bakterien zu töten, machte ich den Versuch, die Wurzeln vor dem Zerschneiden einige Sekunden lang in Alkohol zu tauchen. Ich hoffte, daß dieser den im Innern der Zellen befindlichen Pilz nicht schädigen werde, doch erhielt ich, selbst nach nur einmaligem, eine Sekunde währendem Aufenthalt in Alkohol, niemals ein Austreiben der Hyphen. Ich machte auch Versuche mit mineralischen Nährböden, in denen ich zum Teil Asparagin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle gab, zum Teil Ammoniumsalze und Kartoffelstärke als solche verwendete. Doch erfolgte auf diesen Böden niemals ein Wachstum des Pilzes.

Mehrere Male, zu verschiedenen Jahreszeiten, streute ich in besonders üppige, möglichst bakterienfreie Licht- und Dunkelkulturen Samen verschiedener *Pirola*-Arten, um durch die Einwirkung des Pilzes Keimung hervorzurufen. Doch hatte ich damit niemals Erfolg, vielleicht zum Teil deshalb, weil der Pilz schon nach wenigen Tagen abstirbt und diese Zeit nicht zum Hervorrufen der Keimung ausreicht. Die Samen wiesen nach vier Monate langem Liegen in den Kulturen auch bei mikroskopischer Untersuchung keinerlei Veränderung auf.

V. Diverse Beobachtungen.

A. Der Bau der Blattepidermis von *Pirola chlorantha*.

An Querschnitten durch frische Blätter von *P. chlorantha* sieht man, daß die Epidermiszellen sowohl der Ober- als auch der Unterseite Chlorophyll in sehr merkwürdiger Anordnung enthalten (Fig. 9); die einzelnen kleinen rundlichen Körner liegen alle in einer Linie, die parallel zur Fläche des Blattes schnurgerade durch die Mitte der Zellen geht. Es sieht aus, als ziehe sich ein Faden, auf dem die Chlorophyllkörner aufgereiht sind, durch sämtliche Epidermiszellen. An Flächen-schnitten, die mindestens die Dicke der halben Epidermiszelle umfassen, sieht man an der Chlorophyllanordnung nichts Besonderes: Die einzelnen Körner sind ziemlich regelmäßig über die ganze Fläche verstreut, wobei die

Blattunterseite mehr und größere Körner enthält als die Oberseite. Schneidet man aber die Zellen jenseits der das Chlorophyll bergenden Plasmaplatte durch, so ist das gesamte Chlorophyll plötzlich verschwunden, da es genau in einer Ebene ungefähr in halber Höhe der Epidermiszellen liegt. Nur die Schließzellen der Spaltöffnungen, die an der Blattunterseite zahlreich vorhanden sind, ragen über diese Ebene hinaus und daher sieht man dieselben in solchen zu hoch geführten Schnitten als die einzigen plasma- und chlorophyllhaltigen Zellen des ganzen Bildes.

Ich untersuchte, ob sich die Lage der Chlorophyllkörner unter dem Einfluß des Lichtes ändere. Nach Einwirkung von intensivem Sonnenlicht während ein bis vier Stunden zeigte sich keinerlei Veränderung, ebensowenig nach mehrstündigem bis sechstägigem Verweilen im Finstern. Stets behielten die Chlorophyllkörner ihre charakteristische Stellung in einer Ebene bei und auch an Flächenschnitten konnte ich keinerlei Umlagerung konstatieren, die Körner waren in jedem Fall ziemlich gleichmäßig über die ganze Fläche verstreut.

Es fragt sich nun, ob der Protoplasmagehalt dieser Zellen nur aus einer Platte besteht, die in halber Höhe derselben parallel zur Fläche des Blattes liegt und in die die Chlorophyllkörner eingebettet sind, oder ob außerdem, wie bei allen bisher bekannten Zellarten, ein plasmatischer Wandbelag vorhanden ist, der, nicht ohne weiteres sichtbar, erst durch mikrotechnische Behelfe deutlich gemacht werden mußte. Um diese Frage zu beantworten, wandte ich zuerst Färbemethoden an: ich fixierte das zu untersuchende Material in 1% Essigsäure und färbte dann mit Gentianaviolett. Dadurch zeigte sich mir die auch ohne Färbung sichtbare Plasmaplatte, die in halber Höhe sämtliche Epidermiszellen durchzieht, sowie der in der Mitte derselben liegende Kern, aber keine Spur eines Wandbelages. Denselben Erfolg hatte die Färbung mit Safranin.

Um mir mittels Plasmolyse Klarheit über die Verteilung des Plasmas zu verschaffen, benutzte ich 10% KNO_3 . Brachte ich Blattquerschnitte in diese Lösung, so konnte ich niemals, bei keiner einzigen Epidermiszelle, selbst nicht nach mehr-

stündiger Einwirkung, irgendeine als Plasmolyse zu deutende Veränderung beobachten. Während diejenigen Zellen des Mesophylls, die durch den Schnitt unverletzt geblieben waren, nach einigen Minuten typische Plasmolyse zeigten, blieben die Epidermiszellen stets unverändert und obwohl ich den Versuch öfters wiederholte, auch mit konzentrierteren Lösungen (bis zu 30 %), sah ich niemals wandständiges Protoplasma sich loslösen. Ob solches wandständiges Plasma aber auch wirklich fehlt, das zu entscheiden wage ich nicht, da ein solcher Fall meines Wissens im Pflanzenreich nicht bekannt ist.

Bei Anwendung des genannten Plasmolytikums auf Flächenschnitte zeigte sich nach kurzer Zeit ein stark lichtbrechender Körper, der zuerst die ganze Plasmaplatte bedeckt, dann aber meistens um den Kern herum einen kreisrunden Hof freiläßt und sich langsam, wie in Plasmolyse, von der Zellwand löst. In den meisten Zellen bildet sich dann noch eine vom Kern ausgehende Durchbrechung dieser Masse, die entweder so weit geht, daß sie in zwei voneinander ganz getrennte Teile zerfällt oder nur eine halbmondförmige Lagerung derselben um den Kern zur Folge hat. Bei diesen Vorgängen lösen sich gewöhnlich kleinere Partikelchen von der Hauptmasse los und erfüllen in Form von stark lichtbrechenden Kügelchen den Raum zwischen den großen, ebenfalls abgerundeten Massen und der Zellwand. Die Plasmaplatte aber mit den eingestreuten Chlorophyllkörnern bleibt unverändert und kann selbst unter Zuhilfenahme von 30 % KNO_3 nicht zum Loslösen von der Wand gebracht werden.

Der eben beschriebene Vorgang zeigt viel Ähnlichkeit mit der von Hugo de Vries beschriebenen Bildung von Gerbstoffvakuolen in plasmolisierenden Spirogyrazellen. Der Unterschied besteht aber darin, daß de Vries außer der Vakuolenbildung immer noch Plasmolyse beobachtete. Mit Vakuolen scheinen wir es auch hier zu tun zu haben, doch enthalten sie keinen Gerbstoff. Ich führte die Prüfung nach den Angaben von de Vries aus: Die Schnitte werden in eine 10prozentige KNO_3 -Lösung gelegt, die etwas FeCl_2 enthält; es erfolgte auch nach 24stündigem Verweilen in der

Lösung keine Schwärzung, respektive Bläuung und von dem lichtbrechenden Körper war nach dieser Zeit nichts mehr zu sehen. Wenn man frische Schnitte in einprozentige Antipyrinlösung legt, entsteht nach einigen Stunden in den Zellen ein sehr feinkörniger Niederschlag, der sich in Brown'scher Molekularbewegung befindet, nach O. Loew ein Beweis für das Vorhandensein eines im Zellsaft gelösten Proteinstoffes.

Die übrigen *Pirola*-Arten enthalten auch Chlorophyll in der Epidermis der Blätter, und zwar stets mehr an der Unter- als an der Oberseite, doch ist es niemals in dieser charakteristischen Weise angeordnet. Bei Einwirkung von 10 % KNO_3 findet immer Plasmolyse und Vakuolenbildung statt.

B. Über die Verbreitung von Phloroglucotannoiden bei den *Pirola*-Arten.

Macht man einen Schnitt durch das Rhizom einer *Pirola*-Art, so färbt sich dieser sofort schwarz, es ist durch die Berührung mit dem Messer eine Gerbstoffreaktion eingetreten. Eine noch intensivere Schwärzung erhält man bei Behandlung mit FeSO_4 . Prüft man mit dem Joachimowitz'schen Reagens, das ist eine Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in Schwefelsäure, auf Phloroglucotannoide, so erhält man eine schöne Rotfärbung. Ganz besonders reichlich ist diese Phloroglucin-Gerbstoffverbindung in den äußersten Zellschichten des Rhizoms vorhanden, weniger reichlich in allen anderen Partien desselben. Auch die Blattflächen, Blatt- und Blütenstiele von *P. secunda*, *minor* und *chlorantha* enthalten diese Verbindung, hauptsächlich in den Gefäßbündeln. In sehr geringem Maße ist sie auch in denen von *P. uniflora* vorhanden. Auch die Wurzeln sämtlicher untersuchter *Pirola*-Arten enthalten Phloroglucotannoide, am stärksten färben sich die abgestorbenen, braunen Hyphenmassen im Innern der Epidermiszellen. Alle Gewebe, welche mit diesem Reagens eine Rotfärbung geben, schwärzen sich bei Behandlung mit FeSO_4 mehr oder minder intensiv. Bei Behandlung mit HCl färben sich die verholzten Partien rot, sie geben infolge des Vorhandenseins von Phloroglucin und vielleicht verwandter Körper die Wiesner'sche Holzstoffreaktion.

C. Über einen schön krystallisierenden Inthaltskörper der *Pirola uniflora*.

Bringt man einen eben angefertigten Schnitt durch ein frisches Blatt von *P. uniflora* in destilliertes Wasser, so scheiden sich fast momentan aus dem Gewebe einzelne Krystalle ab. Innerhalb weniger Minuten ist alles übersät mit gelblich bis schwarz gefärbten spießförmigen Krystallen. Im Gewebe des Blattes liegen sie kreuz und quer übereinander und am Rande desselben bilden sie einen ganzen Kranz von abstehenden Nadeln. Meistens sind sie zu rutenförmigen

Büscheln vereinigt, doch treten sie oft auch einzeln auf: auch verzweigte Spieße sind häufig (Textfig. 1).

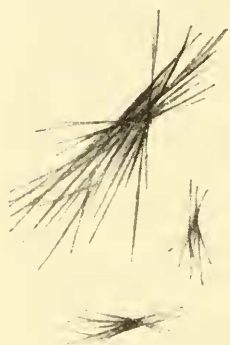


Fig. 1.

Es zeigte sich, daß die Entstehung dieser Krystalle nicht an die Einwirkung des Wassers gebunden ist, sondern daß sie durch das Eintreten des Todes bedingt ist und das Wasser dabei nur insofern eine Rolle spielt, als die Krystalle darin verhältnismäßig wenig löslich sind und es sich daher sehr gut als Untersuchungsmedium eignet. Denn auch durch Äther

oder Chloroformdämpfe abgetötete Pflanzenteile, die nicht mit Wasser in Berührung gekommen waren, wiesen reichliches Vorhandensein von Krystallen auf. Ihre Entstehung erklärt sich so, daß nach Eintritt des Todes Stoffe, die bis dahin räumlich voneinander getrennt waren, aufeinandertreffen und aus ihrer Vereinigung ein unlöslicher Körper resultiert.

Nicht nur die Blätter, sondern auch alle anderen oberirdischen Organe von *P. uniflora* enthalten einen unter denselben Bedingungen auskrystallisierenden Körper; jedoch unterscheiden sich die Krystalle, die aus den verschiedenen Teilen der Blüte (Blütenblatt, sterile Teile des Fruchtknotens und der Staubgefäße) gewonnen werden können, von denen der Blätter und Stiele dadurch, daß sie stets dunkler gefärbt und kürzer und breiter geformt sind; man kann diese Krystalle

wohl kaum mehr als spießförmig bezeichnen (Textfig. 2). In ihren chemischen Eigenschaften stimmen sie mit denen der Blätter überein. Ein Unterschied besteht darin, daß in Präparaten aus grünen Teilen der Pflanze in Wasser nach mehreren Tagen die Krystalle auf immer spurlos verschwinden, während Krystalle aus Blütenteilen unter denselben Bedingungen wohl auch zuerst verschwinden, nach kurzer Zeit



Fig. 2.



Fig. 3.

jedoch als grünlliche, spießförmige, zu großen kugeligen Aggregaten vereinigte Krystalle wieder ausgefällt werden und in dieser Form unverändert bleiben. Die Löslichkeitsverhältnisse dieser neuen Krystalle stimmen mit denen der ursprünglichen überein. Ursache dieser zweiten Ausfällung dürfte wohl die von der der grünen Teile verschiedene chemische Zusammensetzung der Blüte sein, welche irgendein fällend wirkendes Agens zu enthalten scheint, das den Blättern fehlt.

Eine Methode, um den unbekannten Körper in reiner Form zu erhalten, fand ich in der Sublimation; ein einziges Blatt von *P. uniflora* liefert einen überaus dichten goldglänzenden Beschlag von großen, federförmigen, reich verzweigten Krystallen (Textfig. 3). Dieselben stimmen in ihren Löslichkeitsverhältnissen genau mit denen der aus Schnitten ausfallenden überein, woraus auf ihre Identität mit denselben geschlossen werden kann. Sublimationskrystalle aus Blütenteilen zeigen in jeder Hinsicht genaue Übereinstimmung mit solchen aus Blättern. Aus Herbarmaterial, das ein Alter von 70 Jahren besaß, konnten noch ganz unveränderte Krystalle gewonnen werden. Außer den gewöhnlichen stark verzweigten und gekrümmten Spießen traten aber in solchen aus Herbar-

material gewonnenen Sublimationspräparaten noch zweierlei Krystalle auf: 1. farblose bis hellgelbe rhombische Blättchen, zum Teil mit einspringenden Winkeln, die durch Verwachsung mehrerer Krystalle entstehen; 2. leuchtend grün gefärbte, flache, rhombische Prismen, die meist kettenartig aneinandergehängt sind. Die drei Arten von Krystallen entstehen bei der Sublimation in derselben Reihenfolge, in der ich sie hier beschrieben habe, stimmen in ihren Löslichkeitsverhältnissen miteinander überein und da auch Übergänge von einer Form in die andere häufig sind, kann man wohl mit Recht annehmen, daß wir es hier mit ein und demselben Körper zu tun haben, der unter verschiedenen Bedingungen verschieden krystallisiert.

Alle im vorhergehenden beschriebenen und abgebildeten Krystalle sind also verschiedene Formen derselben chemischen Substanz, deren Identifizierung oder Einreihung in eine bestimmte Gruppe mir bisher nicht gelungen ist. Zur Charakterisierung derselben seien im folgenden einige Löslichkeitsverhältnisse erwähnt.

Die aus Schnitten ausgefällten oder durch Sublimation gewonnenen Krystalle sind löslich in:

Methylalkohol: sehr gut;

Äthylalkohol: » »

Amylalkohol: » »

Äthyläther: » »

Petroläther: » »

Benzin: » »

Xylol: » »

Glyzerin: sehr wenig;

Essigsäure: sehr gut;

Pikrinsäure: wenig;

H_2SO_4 : sehr gut, mit brauner Farbe, wahrscheinlich infolge geringer Verunreinigungen;

HCl: wenig;

HNO_3 : sehr gut;

KOH: wenig;

NH_3 : »

Die anderen *Pirola*-Arten enthalten diesen Körper nicht.

Zusammenfassung.

I. Die untersuchten *Pirola*-Arten pflanzen sich in der Regel nur auf vegetativem Wege fort; Keimlinge sind sehr selten. Gefunden wurde ein solcher von *P. chlorantha*, der mit den aus der Literatur bekannten genau übereinstimmt, und einer von *P. uniflora*, der ein unterirdisches, walzenförmiges Gebilde vom anatomischen Bau einer Wurzel darstellt, das sich wahrscheinlich durch Pilzsymbiose ernährt und dessen weitere Entwicklung unklar ist. Keimungsversuche verliefen resultatlos.

II. Die genaue anatomische Untersuchung des Samens zeigte den ungegliederten Embryo, umhüllt von einer einfachen Lage derber Zellen, dem Endosperm, und die Testa.

III. Die Mykorrhiza ist endotroph und obligatorisch. Die Verpilzung erstreckt sich über die ganze Länge der Wurzel, ist aber auf die Epidermiszellen beschränkt. Die Infektion hat eine Hypertrophie derselben zur Folge. Die hypertrophierten Zellen werden allmählich ganz vom Pilz erfüllt, der den lebenden Zellinhalt zum Absterben bringt und dann selbst unter Klumpenbildung zugrunde geht. Wurzelhaare treten nur an nicht infizierten Wurzeln von *P. uniflora* auf.

IV. Bei den Kulturversuchen des Mykorrhizapilzes trat schon nach ein bis zwei Tagen an den Schnittflächen der Wurzeln ein Pilz in Büschelform auf. Wegen der Menge der den Wurzeln anhaftenden Bakterien konnte nicht zur absoluten Reinkultur und zur Identifizierung des Pilzes geschritten werden.

V. Die Epidermiszellen des Blattes von *P. chlorantha* enthalten in halber Höhe eine chlorophyllhaltige Plasmaplatte, die parallel zur Fläche des Blattes liegt. Plasmolyse konnte an diesen Zellen nicht hervorgerufen werden, sondern nur Bildung von Vakuolen. Ein plasmatischer Wandbelag war nicht nachweisbar.

Phloroglucotannoide sind bei den *Pirola*-Arten reichlich vorhanden. Die oberirdischen Organe von *P. uniflora* enthalten eine organische Verbindung, die beim Absterben in Wasser oder Ätherdampf massenhaft abgeschieden wird und die durch Sublimation in Krystallen leicht gewonnen werden kann. Ihre chemische Natur ist noch nicht bekannt.

Literaturverzeichnis.

- Burgeff H., Die Wurzelpilze der Orchideen. (Fischer, Jena 1909.)
Drude O., Pirolaceae. (Engler-Prantl, IV, 1, 1889.)
Frank B., Über neue Mykorrhiza-Formen. (Ber. d. d. bot. Ges., 1887.)
Goebel K., Organographie der Pflanzen. (Fischer, Jena 1913.)
Irmisch Th., *Pyrola uniflora* und *secunda*. (Flora, 1855.)
Joachimowitz M., Ein neues Reagens auf Phloroglucin etc. (Biochem. Zeitschr., 82. Bd.)
Kinzel W., Lichtkeimung. (Ber. d. d. bot. Ges., 1909.)
— Frost und Licht als beeinflussende Kräfte bei der Samenkeimung.
Koch L., Die Entwicklung des Samens von *Monotropa Hypopitys* L. (Jahrb. f. wiss. Bot., 1882.)
Kramář U., Studie über die Mykorrhiza von *Pirola rotundifolia*. (Bull. int. de l'acad. de Bohème, 1899.)
Loew O., Die chemische Energie der lebenden Zelle. (Wolff, München 1899.)
Molisch H., Mikrochemie der Pflanze. (Fischer, Jena 1913.)
— Indigo. (In Wiesner's »Rohstoffe des Pflanzenreiches«.)
Stahl E., Der Sinn der Mykorrhizen-Bildung. (Jahrb. f. wiss. Bot., 1900.)
Velenovsky Jos., Die Keimpflanzen der Pirolaceen. (Bull. int. de l'acad. des sciences de Bohème, 1905.)
de Vries H., Plasmolytische Studien über die Wand der Vakuolen. (Jahrb. für Bot., 1885.)
-

Figurenerklärung.

1. Keimling (Prokaulom) von *P. uniflora*. Nat. Gr.
k = Knospe.
 2. Samen von *P. minor*. Vergr. 180.
t = Testa, *e* = Endospermkörper mit Embryo, *a* = abgestorbene Zellen.
 3. Längsschnitt durch den Samen von *P. minor*. Vergr. 240.
t = Testa, *e* = Endosperm, *emb* = Embryo.
 Die beiden Enden der Testa waren zurückgekrümmt, fallen daher nicht in den optischen Schnitt.
 4. Querschnitt durch den Samen von *P. minor*. Vergr. 250.
w = Zellwand der Testa, *l* = Lumen der Testazellen, *e* = Endosperm, *emb* = Embryo.
 5. Epidermis einer Wurzel von *P. uniflora* im Moment der Infektion. Vergr. 250.
k = Kerne, *h* = Wurzelhaare, *p* = Pilzhypen.
 6. Dieselbe schon hypertrophiert. Vergr. 250.
e = Epidermis, *r* = Rindenparenchym, *k* = Kerne, *p* = Pilzhypen.
 7. Dieselbe in einem weiteren Stadium der Verpilzung. Vergr. 250.
k = Kern.
 8. Querschnitte durch eine Wurzel von *P. uniflora*. Vergr. 250.
z = Zentralzylinder, *r* = Rindenparenchym, *e* = Epidermiszellen mit abgestorbenen Pilzmassen.
 9. Querschnitt durch die Blattepidermis von *P. chlorantha*. Vergr. 250.
p = Plasmaplatte mit Chlorophyllkörnern.
-